QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER 2-HYDROXY-ÖSTROGENE IM MENSCHLICHEN SERUM UNTER VERSCHIEDENEN PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN

Franz Xaver Thaler

1983

AUS DER I. FRAUENKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. J. ZANDER

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER 2-HYDROXY-ÖSTROGENE IM MENSCHLICHEN SERUM UNTER VERSCHIEDENEN PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN

INAUGURAL - DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN

AN DER LUDWIG MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON

FRANZ XAVER THALER

MÜNCHEN 1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Erich Kuss
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Zander
Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 03. 05. 1983

UNIV.
LEIDEN
MIL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

2. MATERIAL

3. METHODE

3.1. Grundlagen der Methode
3.2. Antikörpergewinnung
3.2.1. Synthese des Antigens und Gewinnung der Antikörper
3.2.2. Charakterisierung der Antikörper
3.3. Synthese des ^{125}J markierten Indikatorhaptens
3.3.1. Extraktion und Reinigung
3.3.2. Demethylierung zu 2-Hydroxy-Östron-17-cmo-^{125}J-Histamin
3.4. Synthese von 2-Hydroxy-Östron-^{3}H
3.5. Versuchsdurchführung
3.5.1. Probenansatz
3.5.2. Extraktion
3.5.3. Radioimmunoassay
3.5.4. Auswertung
3.6. Zuverlässigkeit der Methode
3.6.1. Wiederfindung
3.6.2. Leerwerte
3.6.3. Empfindlichkeit
3.6.4. Richtigkeit
3.6.5. Präzision
3.6.6. Spezifität
3.6.7. Praktische Bewährung der Methode

4. ERGEBNISSE

5. DISKUSSION

6. ZUSAMMENFASSUNG

7. LITERATURVERZEICHNIS

DANKVERMERK

LEBENSLAUF

1. EINLEITUNG

Im menschlichen Organismus wird Östradiol-17ß hauptsächlich auf zwei wahrscheinlich kompetitiven Wegen irreversibel metabolisiert: über die Ring D-Hydroxylierung zum "klassischen" Östriol und über die Ring A-Hydroxylierung zu den "neueren" Katecholöstrogenen (12, 50).
Die Katecholöstrogene mit ihren typischen Vertretern 2-Hydroxy-Östradiol-17ß und 4-Hydroxy-Östradiol-17ß sind als ortho-Diphenole alkali-, licht- und oxidationsempfindlich; sie wurden deswegen erst in neuerer Zeit als Bestandteile biologischer Flüssigkeiten nachgewiesen. Im allgemeinen liegt die Konzentration der 2-Hydroxy-Östrogene um ein Mehrfaches höher als die der 4-Hydroxy-Östrogene.
Unter physiologischen Bedingungen werden bei der Frau etwa gleich große Mengen von Östradiol am Ring A hydroxyliert wie am Ring D. Unter pathologischen Bedingungen verschiebt sich diese Relation. Bei Anorexie wird Östradiol vermehrt in Position 2 hydroxyliert, bei Adipositas erfolgt bevorzugt 16a-Hydroxylierung. Auch bei Hyperthyreose erfolgt eine verstärkte Bildung von 2-Hydroxy-Östrogenen, während Hypothyreose wieder mit verstärkter Ring D-Hydroxylierung einhergeht. Bei Leberzirrhose zeigt sich eine Abnahme der 2-Hydroxylierung, bei gleichzeitiger Zunahme der 16a-Hydroxylierung. Insgesamt bleibt aber die Hydroxylierung aufgrund einer Schädigung der Mikrosomen vermindert (22, 24, 33, 54).
Die Hydroxylierung der Östrogene zu den ortho-Diphenolen wurde lange Zeit als Inaktivierungsreaktion gedeutet. Seit einigen Jahren liegen aber auch Hinweise dafür vor, daß Katecholöstrogene selbst regu-

lativ auf den Stoffwechsel einwirken, den weiblichen Zyklus und/oder den Blutdruck im allgemeinen Kreislauf beeinflussen (27, 32, 38, 39, 42, 44).

Die molekulare Grundlage der physiologischen Wirkung der Katecholöstrogene wird in ihrer Strukturverwandtschaft mit den Katecholaminen gesehen, die ebenfalls einen aromatischen Ring mit zwei Hydroxylgruppen in ortho-Stellung besitzen.
Breuer et al. (15) und Knuppen et al. (36) bewiesen die kompetitive Hemmung der Katecholmethyltransferase der Rattenleber durch 2-Hydroxy-Östrogene.
Ball et al. (8) wiesen für die Katecholmethyltransferase der menschlichen Leber sogar eine höhere Affinität zu 2-Hydroxy-Östrogenen als zu Adrenalin und Noradrenalin nach. Die kompetitive Hemmung der Methylierung der Katecholamine durch 2-Hydroxy-Östrogene betrug dabei mehr als 90 %.
Ball et al. (7) zeigten für das synthetische 2-Hydroxy-17a-Äthinylöstradiol, daß dieses Katecholöstrogen die Metabolisierung der Katecholamine sogar stärker hemmt, als die natürlich vorkommenden Katecholöstrogene. Daraus läßt sich ein Zusammenhang mit dem gelegentlichen Auftreten von Hypertonie nach Einnahme von 17a-Äthinylöstradiol als Bestandteil der oralen Kontrazeptiva ableiten (49). Ebenfalls als Hemmung des Katecholaminabbaus durch Katecholöstrogene interpretieren Ball et al. (8) eine Beobachtung von Chesley et al. (17), daß nach Gabe von Noradrenalin bei schwangeren Frauen die erhöhten Blutdruckwerte später zur Norm zurückkehrten als bei nichtschwangeren Frauen.
Die Tyrosinhydroxylase, das für die Einführung der zweiten Hydroxylgruppe in ortho-Stellung des Tyrosin verantwortliche Enzym, wird ebenfalls durch 2-Hydroxy-

Östrogene gehemmt. Auf diese Weise kann die Biosynthese der Katecholamine durch Katecholöstrogene beeinflußt werden (27, 38).
Katecholöstrogene beeinflussen auch die Lipidperoxidation durch die Cytochrom-c-Reduktase. Bereits niedrige Dosen von 2-Hydroxy-Östron verursachen eine komplette Hemmung der Lipidperoxidation durch dieses Enzym (39).
Zur näheren Charakterisierung ihrer physiologischen Bedeutung wurden bereits frühzeitig Methoden entwickelt, Katecholöstrogene in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben zu bestimmen. Ältere Methoden unter Verwendung der Spektrophotometrie oder der Massenspektrometrie waren wenig empfindlich und zeitraubend. Es mußten große Probenvolumina extrahiert werden. Die Extrakte wurden mit aufwendigen chromatographischen Schritten gereinigt. Reihenbestimmungen mit großer Probenzahl bei kleinen Probenvolumina, wie sie zur ausreichenden Charakterisierung physiologischer oder pathologischer Konzentrationsverläufe notwendig wäre, konnten nicht durchgeführt werden.
Seit neuerer Zeit stehen radioimmunologische Methoden zur Verfügung, mit denen die Bestimmung der Katecholöstrogene in größeren Serien praktikabel gemacht werden konnte, ohne die Spezifität maßgeblich zu beeinträchtigen. Die Angaben der verschiedenen Arbeitsgruppen über die Konzentrationen der 2-Hydroxy-Östrogene im Serum sind widersprüchlich und stützen sich auf kleine Probenzahlen.
Aufgabe dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines zuverlässigen Radioimmunoassays freie und konjugierte 2-Hydroxy-Östrogene im Serum unter verschiedenen physiologischen Bedingungen quantitativ zu bestimmen. Besonderer Wert wurde auf die Konzentrationsverläufe

in der Schwangerschaft und die vergleichende Bestimmung bei Mutter und Neugeborenem gelegt.

2. MATERIAL

Reagenzien

Alle Reagenzien und Lösungsmittel, Reinheitsgrad p. A., wurden soweit nicht anders angegeben von E. Merck, Darmstadt bezogen. Diäthyläther (pro narcosi, Hoechst, Frankfurt) wurde nur aus frisch geöffneten Flaschen verwendet.

Steroide und markierte Substanzen

2-Hydroxy-Östron (Sigma Chem. Co. Louis, USA)
2-Hydroxy-Östron-^{3}H wurde aus 2-Methoxy-Östron-^{3}H (spez. Aktivität 10 Ci/mMol von Amersham Buchler, Braunschweig) hergestellt (siehe 3.4.).
^{125}J-Jodhistamin (spez. Aktivität 2200 Ci/mMol; New England Nuclear Co. Boston)

Die Steroide wurden mittels Dünnschicht- oder Säulenchromatographie auf Reinheit geprüft.

Geräte

Automatische Pipetten:
Mikroliterpipetten (Eppendorf, Hamburg)
Finnpipetten (Friedrich & Hoffmann, Gräfelfing)
Dispenser (Swelab, Stockholm)
Zentrifuge Rotanta/S (Hettich, Tuttlingen)
Vortex-Mixer (Bender & Hobein, München)
Thermoblock Dri-Block DB3 Tecam^{R} (Techne Limited, Duxford Cambridge, England)

Messung der Radioaktivität

Die ^{125}J markierten Proben wurden im Gamma-Zähler

1270 Backgamma LKB gemessen. Die Zählausbeute betrug 69 %, gezählt wurde eine Minute.
Die Tritium-Messung erfolgte im Flüssigkeitsszintillationszähler Modell 2425 der Firma Packard. Die Zählausbeute betrug 52 %, gezählt wurde zwei Minuten.

Lösungen

Phosphatpufferlösung:

2,686 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), 8,356 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und 0,325 g Natriumnitrit (NaN_3) wurden in einem Liter Aqua pro injectione (B. Braun, Melsungen) gelöst. Dieser Phosphatpuffer hatte ein pH von 7,2.

Ascorbinsäurepuffer:

2,24 g EDTA und 0,66 g Ascorbinsäure wurden in 140 ml Aqua pro injectione gelöst und dann 0,3 g Lysozym (Boehringer, Mannheim) zugegeben.
Dieser Puffer wurde jeden Tag neu hergestellt und erst vor Gebrauch mit ca. 9,6 ml 1 M NaOH auf pH 7,4 titriert. (Gesamtvolumen 150 ml).

Szintillationslösung:

100 g 2,5-Diphenyloxazol und 1,25 g 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol (W. Zinsser, Frankfurt) wurden in 1 l Toluol gelöst. 42 ml dieser Lösung und 117 ml Bio-Solv (Beckmann Instruments GmbH, München) wurden mit 1 l Toluol vermischt. Die ^3H-markierten Proben wurden im Flüssigkeitsszintillationszähler mit 15 ml dieser Lösung gemessen.

Dextrankohlesuspension

0,5 g Norit A (4 - 5 µm; Serva, Heidelberg) und 0,05 g Dextran T 70 (Pharmazia, Uppsala) wurden in 100 ml Phosphatpuffer (pH 7,2) suspendiert und bei

4° C dauernd gerührt. Die Suspension wurde vor erstmaligem Gebrauch mindestens 24 Stunden gerührt.

Reinigung der Glaswaren

Alle wiederverwendeten Glaswaren wurden nach Gebrauch 24 Stunden in eine RBS - 50 - Lösung (Roth, Karlsruhe) gelegt, mit Wasser gespült, anschließend 24 Stunden in Dichromatschwefelsäure gelegt und zuletzt mit destilliertem Wasser ausgespült und bei 100° C getrocknet.

Vor Gebrauch wurden sämtliche Gläser (einschließlich der einmal verwendeten Reagenzgläschen) mit Methanol p. A. vorgespült und bei Raumtemperatur getrocknet.

Biologisches Material

Die Blutproben wurden durch Armvenenpunktion von freiwilligen Spenderinnen gewonnen. Das Blut wurde möglichst bald zentrifugiert. Die Katecholöstrogene im Serum wurden durch Zugabe von 0,2 ml einer wässrigen Ascorbinsäurelösung (3 g pro 100 ml) pro ml Serum stabilisiert.

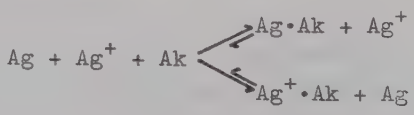
3. METHODE

3.1. Grundlagen der Methode

Bereits 1959/60 berichteten Yalow und Berson (51, 52) über antigene Eigenschaften von Proteohormonen mit relativ niedrigem Molekulargewicht. Sie entwickelten daraus den ersten Radioimmunoassay (RIA) für Insulin.

Seither wurden Radioimmunoassays für verschiedene biologisch aktive Substanzen in Serum, Urin oder Geweben beschrieben. Die radioimmunologische Methode verbindet die hohe Empfindlichkeit der radiochemischen Nachweismethoden (z. B. Isotopenverdünnungsanalyse) mit der großen Spezifität immunologischer Reaktionen. Es ist somit möglich, Hormone noch im Picogrammbereich zu bestimmen. Die hohe Spezifität kommt dadurch zustande, daß die immundeterminante Gruppe des Antigens und die Bindungsgruppe des zugehörigen Antikörpers räumlich ineinander passende, komplementäre Konfiguration besitzen. Antigen und Antikörper passen zueinander wie Schlüssel und Schloß.

Eine wichtige Voraussetzung für die analytische Anwendung des RIA ist, daß die Assoziationskonstanten von unmarkiertem Antigen (Ag) und radioaktiv markiertem Antigen (Ag^+) im gleichen Bereich liegen. Gibt man nun Ag und Ag^+ im Überschuß in ein in vitro System mit dem Antikörper, so konkurrieren sie um die Bindungsstellen des Antikörpers (Ak):



Nach dem Massenwirkungsgesetz gilt nun: je mehr unmarkiertes Ag im Ansatz vorhanden ist, um so weniger radioaktiv markiertes Ag^+ wird an den Antikörper gebunden. Hält man jetzt die Menge des Antikörpers und des radioaktiv markierten Antigens (Ag^+) in allen Proben konstant, so ist der Anteil des an Antikörper gebundenen Ag^+ indirekt proportional der zugegebenen Menge von nicht markiertem Antigen.
Für die quantitative Bestimmung ist es notwendig die Antigen-Antikörper-Komplexe (Ag·Ak, Ag^+·Ak) von freiem Antigen (Ag, Ag^+) nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes zu trennen. Zu diesem Zweck stehen verschiedene Trennmethoden zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde Dextrankohle als Adsorptionsmittel verwendet. Die Dextrankohle bindet das freie Antigen (Ag, Ag^+). Nach konstanter Reaktionszeit trennt man freies Antigen von gebundenem durch Zentrifugieren. Anschließend wird die Radioaktivität des Überstandes bestimmt.

Durch Zugabe von definierten Mengen nicht markierten Antigens zu konstanter Menge von Ak und Ag^+ wird die Erstellung einer Standardkurve möglich.
Durch Vergleich der Meßergebnisse einer unbekannten Probe mit der Standardkurve läßt sich der Gehalt dieser Probe bestimmen.

3.2. Antikörpergewinnung

Der für den Radioimmunoassay benötigte Antikörper stand zu Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung. Die Herstellung des Antigens zur Immunisierung von Kaninchen und die Charakterisierung der gewonnenen Antikörper ist von Berg und Kuss (10) beschrieben und wird hier nur kurz zusammengefaßt dargestellt.

3.2.1. Synthese des Antigens und Gewinnung der Antikörper

2-Methoxy-Östradiol-17-Hemisuccinat wurde aus 2-Methoxy-Östradiol nach der Methode von Abraham und Grover (1) hergestellt und mittels Dünnschichtchromatographie gereinigt.
Die Kopplung des 2-Methoxy-Östradiol-17-Hemisuccinat an Rinderserumalbumin (BSA) wurde nach Erlanger (19) durchgeführt. Die Reinigung des Steroid-Rinderserumalbuminkonjugats erfolgte über eine Sephadex G 25 Säule. Um die Methyläthergruppen des 2-Methoxy-Östradiol-17-Hemisuccinat-Rinderserumalbumins abzuspalten, wurde das Konjugat in 50 %iger Essigsäure mit Natriummetaperjodat oxidiert und anschließend mit Ascorbinsäure reduziert.
Mit dem so erhaltenen Antigen wurden Kaninchen immunisiert und monatlich geboostert. Blutproben wurden drei Monate nach der Erstimmunisierung entnommen und auf ihre Bindung von 2-Hydroxy-Östron-17-cmo(^{125}J)-Histamin geprüft. Das Antiserum von dem die geringste Konzentration zur 50 %igen Bindung des radioaktiven 2-Hydroxy-Östron-Derivates genügte, wurde charakterisiert und für den Radioimmunoassay verwendet.

3.2.2. Charakterisierung des Antikörpers

Die Assoziationskonstante K und die Konzentration der Bindungsstellen q im unverdünnten Antiserum mit 2-Hydroxy-Östron-17-cmo(^{125}J)-Histamin als Radioliganden wurden mit Hilfe der Auswertung nach Scatchard (48) berechnet:

$K = 1{,}9 \times 10^{9}$ l/mol $q = 8{,}0 \times 10^{-6}$ mol/l

Es zeigte sich eine vollständige Kreuzreaktivität zwischen 2-Hydroxy-Östron und 2-Hydroxy-Östradiol und eine geringere Kreuzreaktivität mit 2-Hydroxy-Östriol (41 %). Andere Steroide zeigten vernach-

lässigbar kleine Kreuzreaktivitäten (0,1 %).

3.3. Synthese des ^{125}J markierten Indikatorhaptens

Die Synthese des ^{125}J markierten Indikators erfolgte mittels der gemischten Anhydridmethode, modifiziert nach Erlanger (19), wie bei Berg und Kuss (10) beschrieben.
1,4 mg 2-Methoxy-Östron-17-carboxymethyloxim wurde in 0,5 ml Tetrahydrofuran (THF; wasser- und peroxidfrei) gelöst, auf -5 bis -10° C mittels einer Eis-Kochsalzmischung abgekühlt und nach Zugabe von 0,5 µl Chlorameisensäureisobutylester (in 10 µl THF) und 0,5 µl Triäthylamin (in 10 µl THF) 30 min bei der genannten Temperatur gerührt. Zu dieser Lösung wurde 1 mCi ^{125}J-Histamin in 0,1 ml Phosphatpuffer (pH 8, 0,5 molar) gegeben, das Reaktionsprodukt wurde weitere 3,5 Stunden bei 0° C gerührt.

3.3.1. Extraktion und Reinigung

Nach Zugabe von 0,7 ml Phosphatpuffer (pH 8, 0,5 molar) und 0,2 ml Essigester wurde viermal mit 0,7 ml Essigester extrahiert.
Die Trennung von 2-Methoxy-Östron-17-cmo-^{125}J-Histamin von nicht markiertem Steroid und ^{125}J-Histamin wurde durch Säulenchromatographie erreicht. Der Essigesterextrakt wurde mit Stickstoff eingedampft und in 2 x 0,5 ml Essigsäure/Wasser 9 : 15, dem Elutionsmittel der ersten Säule (Sephadex LH 20, 40 x 1 cm), gelöst und auf die Säule gegeben. Es wurden Fraktionen zu 3 ml gesammelt. Die Fraktionen 30 - 39 ml wurden einrotiert, in 2 x 0,5 ml Benzol/Äthanol/Essigsäure 75 : 24 : 1 gelöst und auf eine Kieselgelsäule (40 x 1 cm) aufgetragen. Die Fraktionen 31 - 46 ml enthielten reines 2-Methoxy-Östron-17-cmo-^{125}J-Histamin, wurden gesammelt, einrotiert und in einer

Ascorbinsäure/Äthanollösung (100 mg pro 100 ml) bei 4° C aufbewahrt.

3.3.2. Demethylierung zu 2-Hydroxy-Östron-17-(O-carboxymethyl)-oxim-^{125}J-Histamin

Um den 2-Methyläther vom Steroid abzuspalten, wurden ca. 70 µCi 2-Methoxy-Östron-17-cmo-^{125}J-Histamin eingedampft, in 0,2 ml 50 %iger Essigsäure gelöst und mit 1,25 mg Natriummetaperjodat (in 0,05 ml H_2O) oxidiert. Die Reduktion zum ortho-Diphenol erfolgte durch Zugabe von 12 mg Ascorbinsäure (in 0,3 ml H_2O). Das Reaktionsgemisch wurde viermal mit 1 ml Dichlormethan (CH_2Cl_2) extrahiert und der Extrakt auf einer Sephadex LH 20 Säule (10 x 1 cm, Benzol/Methanol 9 : 1) gereinigt. Die Fraktionen 39 - 48 ml wurden gesammelt, einrotiert und in 2 ml Ascorbinsäure/Äthanol (100 mg pro 100 ml) bei 4° C aufbewahrt. Die Reinheit des Endproduktes wurde durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel; Benzol/Äthanol/Essigsäure 75 : 24 : 1) geprüft.

3. 4. Synthese von 2-Hydroxy-Östron-^{3}H

0,5 mCi 2-Methoxy-Östron-^{3}H (spez. Akt. ca. 10 Ci/mMol) wurde analog zu 3.2.2. zu 2-Hydroxy-Östron-^{3}H umgesetzt. Die Reinigung erfolgte ebenfalls auf einer Sephadex LH 20 Säule (10 x 1 cm, Benzol/Methanol 9 : 1). Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt. Der Peak in den Fraktionen 16 - 18 enthielt das umgesetzte 2-Hydroxy-Östron-^{3}H. Die Reinheit des Produktes wurde durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel; Benzol/Äthanol/Essigsäure 75 : 24 : 1) nachgewiesen. Zur Aufbewahrung wurden die Fraktionen 16 - 18 eingedampft und in 4 ml Ascorbinsäure/Äthanollösung (100 mg pro 100 ml) gelöst.

3.5. Versuchsdurchführung

3.5.1. Probenansatz

Je nach erwarteter Konzentration an 2-Hydroxy-Östrogenen wurden für die Bestimmung des freien Hormons 0,2 - 0,4 ml Serum und für die Bestimmung von freiem und konjugiertem Hormon 0,05 - 0,1 ml Serum in ein 16 x 100 mm Reagenzglas pipettiert. Von allen Seren wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.
Die Proben für die Bestimmung der konjugierten 2-Hydroxy-Östrogene wurden nach Zugabe von 0,93 ml einer täglich frisch hergestellten Hydrolyselösung (30 mg KJ in 0,75 ml H_2O, 0,15 ml konz. HCl (37 %) und 0,03 ml $Na_2S_2O_5$ (1 %)) gemischt und für eine Stunde in ein kochendes Wasserbad gestellt. Nach dem Abkühlen wurde 0,12 ml 1 %ige Natriumdisulfitlösung zugegeben und mit 0,177 ml 10 M Natronlauge neutralisiert.
Die Proben für die Bestimmung der freien 2-Hydroxy-Östrogene wurden ohne weitere Vorbehandlung mit Diäthyläther extrahiert.
Für die Bestimmung der Wiederfindung (Doppelwerte) wurden ca. 8000 cpm 2-Hydroxy-Östron-^3H in 0,1 - 0,4 ml Männerserum gelöst. Diese Proben wurden anschließend analog zur oben beschriebenen Methodik aufgearbeitet. Ein Einfluß unterschiedlicher Volumina auf die Wiederfindung konnte nicht festgestellt werden.

3.5.2. Extraktion

Nach Zugabe von 2 ml Diäthyläther wurden die Proben paarweise mit einem Vortex Mixer 40 sec. geschüttelt. Die wässrige Phase wurde mittels eines Methanol-Trockeneisgemisches eingefroren (Trockeneis von Agefco-Kohlensäure, München). Die Ätherphase wurde in Einmalgläschen (12 x 75 mm) dekantiert. Dieser

Vorgang wurde zweimal durchgeführt. Bei den hydrolysierten Proben war es nötig, nach dem Schütteln fünf Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zu zentrifugieren, um eine gute Trennung von Äther und wässriger Phase zu gewährleisten. Der Ätherextrakt wurde jetzt unter N_2 in einem Thermoblock bei 40° C eingedampft. Der getrocknete Extrakt wurde mit 1 ml Ascorbinsäure-Puffer gelöst. Die Gläser blieben abgedeckt mit Silberfolie zuerst 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen und wurden danach für 10 Minuten mit Ultraschall behandelt.

3.5.3. Radioimmunoassay

An jedem Versuchstag wurde eine eigene Standardkurve angefertigt. Aus einer 800 ng pro ml 2-Hydroxy-Östron in 1 °/oo Äthanol/Ascorbinsäure enthaltenden Stammlösung wurde 0,1 ml entnommen und mit Ascorbinsäurepuffer auf 800 pg pro ml verdünnt. Von dieser Konzentration ausgehend wurde eine 1 : 1 Verdünnungsreihe bis 6,5 pg pro ml angefertigt. Für die Standardkurve wurde von den sechs Verdünnungen zwischen 6,25 und 200 pg/ml jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. 1,0 ml der Standardlösungen wurde in 12 x 75 mm Reagenzgläser pipettiert. In den Gläsern waren zuvor 4 ml Diäthyläther bei 40° C unter N_2 eingedampft worden.
Zu allen Proben und Standardwerten wurden ca. 8000 cpm 2-Hydroxy-Östron-17-cmo-^{125}J-Histamin in 0,1 ml Ascorbinsäurepuffer und 0,1 ml des verdünnten Antiserums (Endverdünnung 1 : 120 000) pipettiert.

Nach kurzem Schütteln wurden alle Gläser (wieder abgedeckt mit Silberfolie) 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 30 Minuten in Eiswasser bei 0° C inkubiert.
Um die freien Steroide von den antikörpergebundenen

zu trennen, wurde in jedes Glas 0,1 ml Dextrankohle-suspension pipettiert, kurz geschüttelt und nochmals 15 Minuten bei 0° C inkubiert, bevor alle Gläser 5 Minuten bei 3250 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurden. 1,0 ml des Überstandes wurde in ein Zählglas pipettiert und die Radioaktivität im Gamma-Zähler gemessen.

3.5.4. Auswertung

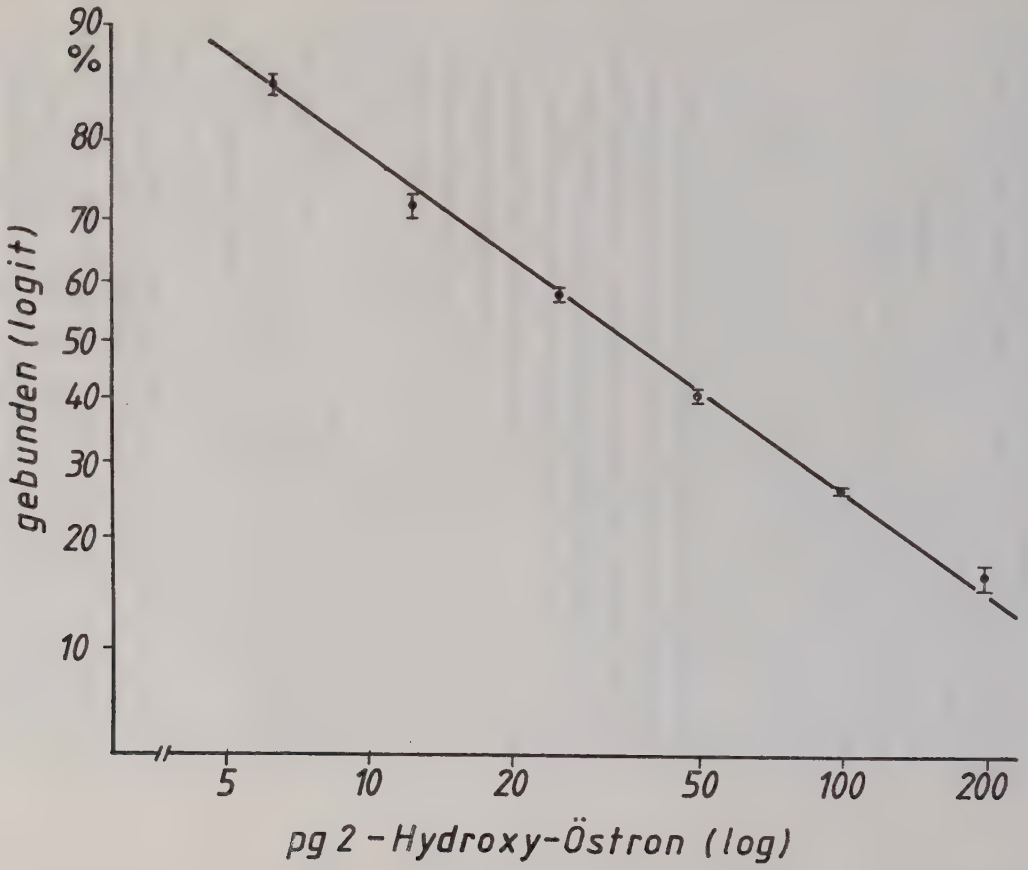
Die vom Gamma-Zähler durch Vergleich mit der Standardkurve ausgerechnete Menge pro Probe wurde nach der Formel

$$\frac{C \times 100}{A \times B} = \text{pg 2-OHE}_1 \text{ pro Plasma auf einheitliches Volumen umgerechnet.}$$

A = Wiederfindung in %
B = Volumen der Probe in ml
C = Gehalt der Probe an 2-OHE_1 (pg)

Es wurden nur Ergebnisse verwendet, bei denen die 2-OHE_1 Menge der bestimmten Probe im Bereich der Standardkurve von 5 - 150 pg lag und die Doppelwerte um nicht mehr als 20 % von ihrem Mittelwert abwichen.

Abb1 : Standardkurve für 2-Hydroxy-Östrogene



3.6. Zuverlässigkeit der Methode

3.6.1. Wiederfindung

Nach dem Lösen der eingedampften Extrakte in 1 ml Ascorbinsäurepuffer und Zugabe von 15 ml Szintillationslösung wurde die Radioaktivität (cpm) der Proben für die Wiederfindung zusammen mit zwei Kontrollwerten im Szintillationszähler ermittelt. Die Wiederfindung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Wiederfindung in \%} = \frac{\text{Mittelwert wiedergefundenes } {}^{3}\text{H-2-OHE}_1 \text{ (cpm)}}{\text{Mittelwert der Kontrollwerte (cpm)}} \times 100$$

Dabei ergaben sich folgende Resultate:

Wiederfindung für die Bestimmung der freien Katecholöstrogene: 85,5 ± 1,2 % (n = 41)

Wiederfindung für die Bestimmung der freien + konjugierten Katecholöstrogene: 75,1 ± 1,4 % (n = 40)

3.6.2. Leerwerte

Ascorbinsäurepuffer (0,1 - 0,4 ml) wurde an jedem Versuchstag analog zu den Serumproben extrahiert und gemessen.

Folgende Resultate wurden erzielt:

2,8 ± 0,5 pg pro Ansatz für die einfache Extraktion (n = 41)

7,0 ± 1,3 pg pro Ansatz für die Extraktion nach der Hydrolyse (n = 40)

Wurde anstelle des Puffers mit Dextrankohle behandeltes Männerserum verwendet, so fanden sich keine signifikant zu unterscheidenden Werte.

3.6.3. Empfindlichkeit

Nach Richterich (46) entspricht die Empfindlichkeit einer Methode derjenigen Analysensubstanz, die bei einer Bestimmung gerade noch nachgewiesen werden

kann.
Der Leerwert für die einfache Extraktion betrug 2,8 ± 1 pg pro Ansatz und für die Extraktion nach der Hydrolyse 7,0 ± 2,6 pg pro Ansatz. Berücksichtigt man noch die durchschnittliche Wiederfindung von 85,5 % bzw. 75,1 %, so errechnet man mit der vorgegebenen statistischen Sicherheit von 95 % die geringsten noch nachweisbaren Konzentrationen zu 11 pg pro ml für die Bestimmung des freien Hormons bzw. 128 pg pro ml für die Bestimmung des freien + konjugierten Hormons, ausgehend von einem Probevolumen von 0,4 bzw. 0,1 ml.

3.6.4. Richtigkeit

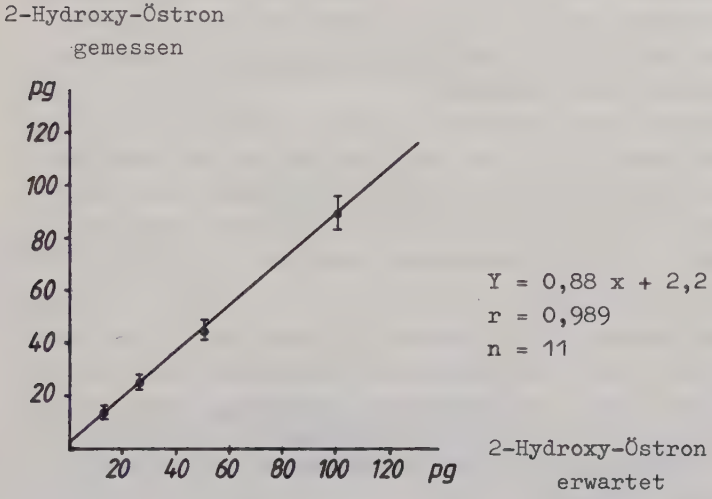
Die Richtigkeit der Methode wurde durch Zusatzversuche mit 2-Hydroxy-Östron beurteilt (Abb. 2). Zu 0,2 - 0,4 ml bzw. 0,1 ml (Hydrolyse) Männerserum wurden 12.5, 25, 50 oder 100 pg 2-Hydroxy-Östron in 0,1 ml Ascorbinsäurepuffer zugegeben und die Proben bestimmt. Von den Ergebnissen wurde der Mittelwert des jeweils verwendeten Männerserums subtrahiert.

Die Regressionsanalyse ergab für gemessenes 2-OHE_1 (Y) aufgetragen gegen erwartetes 2-OHE_1 (X) folgende Gleichungen:

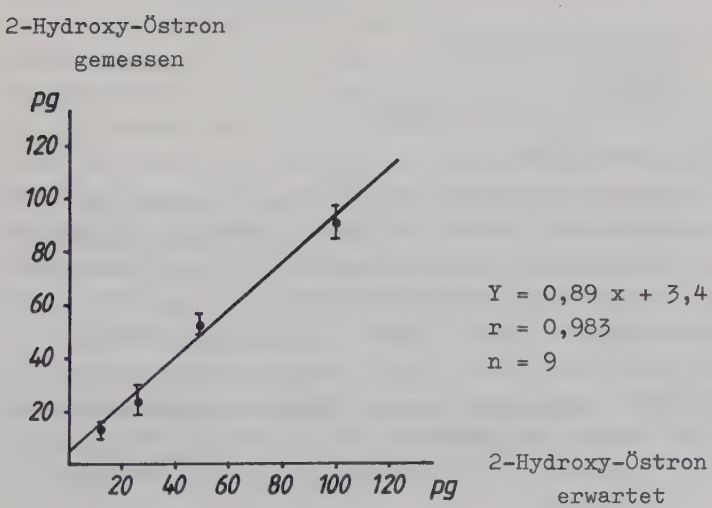
$Y = 0{,}88x + 2{,}2$ mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0{,}989$ bzw.

$Y = 0{,}89x + 3{,}4$ mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0{,}983$.

Abb. 2 Richtigkeit der Methode, Korrelation von erwarteten und gemessenen Werten (2-Hydroxy-Östron)
a. freie 2-Hydroxy-Östrogene



b. freie + konjugierte 2-Hydroxy-Östrogene



3.6.5. Präzision

Zur Ermittlung der Präzision wurde die Abweichung der Resultate innerhalb eines Versuchsansatzes (Repetierbarkeit (46)) und die Abweichung der Resultate der gleichen Probe an verschiedenen Tagen (Reproduzierbarkeit (46)) bestimmt.
Für die Repetierbarkeit ergab sich bei einer 12fachen Bestimmung eines Schwangerenserums der 26. SSW, das 185 pg pro ml freie 2-Hydroxy-Östrogene bzw. 3647 pg pro ml freie + konjugierte 2-Hydroxy-Östrogene enthielt, ein Variationskoeffizient von 6,4 % bzw. 3,5 %.

Für die Reproduzierbarkeit ergaben sich bei 27 Doppelbestimmungen Variationskoeffizienten von 3,7 % bzw. 6,5 %. Dazu wurden Kontrollseren (durch Zugabe von kaltem 2-OHE_1 zu Männerserum hergestellt) mit 142 pg pro ml bzw. 554 pg pro ml verwendet.
Die Variationskoeffizienten wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Variationskoeffizient (in \%)} = \frac{s/\bar{x}}{\sqrt{n-1}} \times 100$$

s = Standardabweichung
$\bar{x}$ = Mittelwert
n = Anzahl der Bestimmungen

3.6.6. Spezifität

Durch die Verwendung sehr spezifisch bindender Antikörper ist eine hohe Spezifität der Methode anzunehmen. Ergänzend wurden 10 Ätherextrakte eines Serumpools der 19. SSW mittels Säulenchromatographie (Benzol/Methanol 9 : 1, 10 x 1 cm) gereinigt. Die Fraktionen 12 - 19 ml, die 2-Hydroxy-Östron enthielten, wurden eingedampft, in 1,0 ml Ascorbinsäurepuffer gelöst und zusammen mit 10 weiteren Proben, die in üblicher Weise aufgearbeitet waren, bestimmt.

Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung (Tabelle 1) sprechen ebenfalls für die hohe Spezifität der Methode.

Tabelle 1 Vergleichende Bestimmung von 2-Hydroxy-Östrogenen

	Methode ohne Chromatographie	Methode mit Chromatographie
$\bar{x} \pm s$ (pg/ml)	177 ± 4	170 ± 10
n	10	10

3.6.7. Praktische Bewährung der Methode

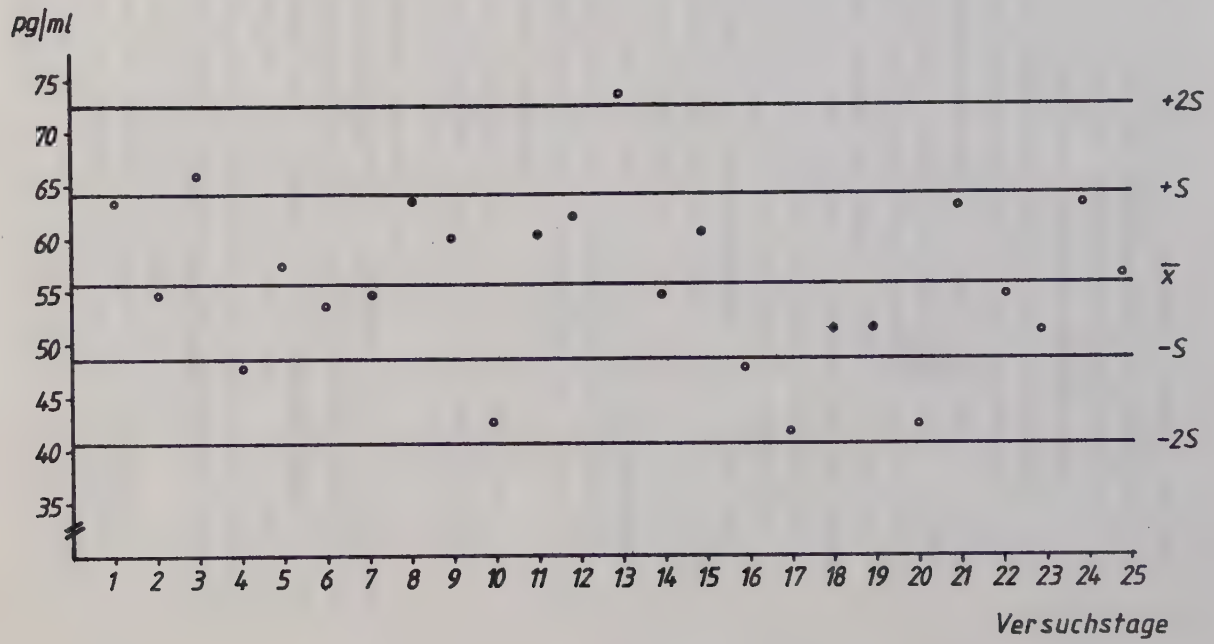
Um die praktische Bewährung des Radioimmunoassays über einen längeren Zeitraum überprüfen zu können, wurde eine Probe eines Kontrollserums an jedem Versuchstag mitbestimmt.
Als Kontrollserum wurde Männerserum verwendet, dem 2-OHE_1 zugesetzt wurde. Der Mittelwert des Kontrollserums betrug 56,4 ± 1,6 pg pro Probe. Aliquots zu je 1 ml wurden bei -25° C gelagert. An jedem Versuchstag wurde eine Probe (Doppelwert) bestimmt. Die Ergebnisse wurden in ein Kontrollblatt eingetragen, auf dem Mittelwert, einfache und doppelte Standardabweichung eingezeichnet wurden. Die Methode ist unter Kontrolle, wenn 66 % der Werte im Bereich $\bar{x} \pm 1s$ liegen und 95 % der Werte im Bereich $\bar{x} \pm 2s$ (46).

Wie aus dem angefertigten Kontrollblatt ersichtlich ist, lagen in dem aufgezeichneten Versuchsabschnitt 72 % der Werte im Bereich $\bar{x} \pm 1s$. Der Wert des

13. Versuchstages lag als einziger außerhalb von $\bar{x} \pm 2s$. Die Proben dieses Versuchsansatzes wurden noch einmal bestimmt.

Abb 3: Kontrollblatt für einen Versuchsabschnitt

$\bar{x}$ = Mittelwert des Kontrollserums
S = Standardabweichung



4. ERGEBNISSE

4.1. Die Bestimmung von 11 Männerseren (Alter 17 - 69 Jahre) ergab einen Mittelwert von 29 ± 5 pg/ml für freie 2-Hydroxy-Östrogene und 453 ± 67 pg/ml für freie + konjugierte 2-Hydroxy-Östrogene.

4.2. Im Serum von 10 Frauen in der Postmenopause wurde eine Konzentration von 13 ± 3 pg/ml bzw. 211 ± 45 pg/ml an 2-Hydroxy-Östrogenen festgestellt.

4.3. Bei 25 Seren von Frauen in der Follikelphase des Menstruationszyklus (2. - 14. Tag) wurden 32 ± 8 pg/ml bzw. 429 ± 47 pg/ml 2-Hydroxy-Östrogene gemessen.

4.4. In der Lutealphase des Menstruationszyklus (15. - 28. Tag) wurde bei 23 Messungen ein Gehalt von 53 ± 13 pg/ml bzw. 519 ± 49 pg/ml an 2-Hydroxy-Östrogenen ermittelt.

4.5. Die Ergebnisse der 2-Hydroxy-Östrogenbestimmung im Verlauf der Schwangerschaft (11. - 40. SSW) sind in Abbildung 4 und Tabelle 2 dargestellt.

4.6. Eine Gegenüberstellung der Meßergebnisse von Serumproben von Müttern am Termin und des zugehörigen Nabelschnurserums findet sich in Tabelle 3. Die Mittelwerte betragen für die Bestimmung der freien 2-Hydroxy-Östrogene im Nabelschnurserum 603 ± 38 pg/ml und 235 ± 22 pg/ml für die Mütter am Termin. Für konjugierte 2-Hydroxy-Östrogene fanden sich Mittelwerte von 3298 ± 295 pg/ml im Nabelschnurserum und 3150 ± 215 pg/ml im Serum der Mutter a. T.. Man sieht bei der Betrachtung der Einzelergebnisse, daß sich für die freien 2-Hydroxy-Östro-

gene praktisch in jedem Einzelfall im Nabelschnurserum ein höherer Wert findet, dagegen ist dies für die konjugierten 2-Hydroxy-Östrogene nur in ca. 50 % der Bestimmungen der Fall.
Die Mittelwerte für die Bestimmung der freien 2-Hydroxy-Östrogene im Nabelschnurserum unterscheiden sich signifikant ($p < 0{,}001$) von den Werten im mütterlichen Serum, während für die konjugierten 2-Hydroxy-Östrogene kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte.

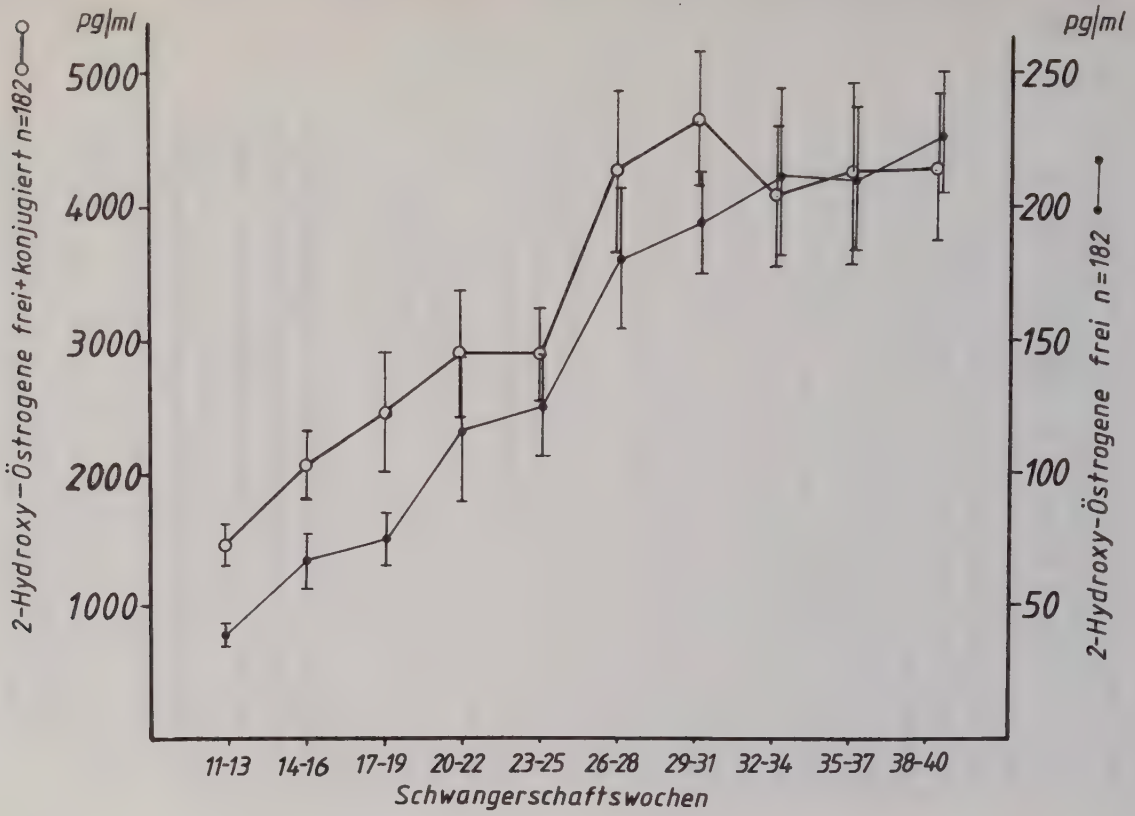


Abb 4: Konzentrationsverläufe für freie, sowie freie und konjugierte 2-Hydroxy-Östrogene im Serum in der Schwangerschaft

Tabelle 2 Mittelwerte der 2-Hydroxy-Östrogenbestimmungen im Verlauf der Schwangerschaft

SSW	n	2-Hydroxy-Östrogene (MW ± s)	
		frei	frei + konjugiert
		pg/ml	pg/ml
10. - 13.	25	42 ± 4	1488 ± 143
14. - 16.	14	68 ± 11	2107 ± 253
17. - 19.	13	77 ± 10	2479 ± 463
20. - 22.	13	118 ± 28	2924 ± 484
23. - 25.	14	127 ± 19	2911 ± 350
26. - 28.	17	182 ± 27	4307 ± 615
29. - 31.	28	196 ± 19	4696 ± 504
32. - 34.	17	213 ± 33	4113 ± 553
35. - 37.	17	213 ± 27	4272 ± 683
38. - 40.	24	240 ± 23	4318 ± 538

Tabelle 3 Vergleich der Serumkonzentrationen von Mutter und Nabelschnur am Termin

freie 2-Hydroxy-Östrogene pg/ml		konjugierte 2-Hydroxy-Östrogene pg/ml	
Mutter	NS	Mutter	NS
218	428	4779	3603
325	545	2308	5976
177	748	3295	3289
112	743	1781	2045
272	510	3067	2397
298	926	2599	2307
418	761	4932	2383
137	597	3157	6784
477	752	4133	3773
85	359	2981	3402
172	740	3425	2976
461	896	4030	2353
304	343	5153	1897
127	939	1595	2226
190	304	3845	4387
222	633	1623	2637
145	706	1789	3248
187	523	3518	3515
210	520	1845	2123
273	578	2925	3436
282	364	2497	2326
256	466	3098	7097
189	528	4307	2968
106	558	2906	2008
235 ± 22	603 ± 38	3150 ± 215	3298 ± 295

(MW ± s)
n = 24

5. DISKUSSION

Durch die Synthese eines 2-Hydroxy-Östradiol-17-Hemisuccinat-BSA Antigens und Immunisierung von Kaninchen gelang die Induktion von spezifischen Antikörpern gegen 2-Hydroxy-Östrogene. Da der Antikörper offensichtlich nicht zwischen 2-OHE_1 und 2-OHE_2 unterscheiden kann und auch mit 2-OHE_3 in höherem Maße kreuzreagiert, eignet sich dieser Antikörper gut für einen Radioimmunoassay zur Bestimmung der "gesamten" 2-Hydroxy-Östrogene.

Als Indikatorhapten wurde 2-Hydroxy-Östron-17-O-cmo-^{125}J-Histamin verwendet. Antigen und Indikatorhapten besitzen unterschiedliche Brückenglieder an C-17. Von diesen sogenannten heterologen Indikatorhapten/Antikörpersystemen ist eine besonders hohe Empfindlichkeit der Methode zu erwarten (3). Die angefertigten Standardkurven von 6,25 - 200 pg mit einer 50 %igen Verdrängung des Indikatorhaptens durch 40 pg 2-OHE_1 bestätigen diese Erwartung.

Die Extraktion der Serumproben mit Diäthyläther ist einfach und bietet den Vorteil der nahezu konstanten hohen Wiederfindung von 85,5 $\pm$ 1,2 %. Da außer dem Diäthyläther nur noch Ascorbinsäurepuffer (zum Lösen des getrockneten Extraktes und als Lösungsmittel für das Indikatorhapten) und Phosphatpuffer (als Lösungsmittel für den Antikörper und die Dextrankohle) für den Assay verwendet werden, ergeben sich die günstigen Leerwerte von 2,8 $\pm$ 0,5 pg pro Ansatz. Dies ist die Grundlage für eine möglichst niedere Grenze der Nachweisbarkeit (46).
Dagegen ist die Bestimmung der 2-Hydroxy-Östrogene nach Hydrolyse zeit- und arbeitsaufwendiger als die

Bestimmung der freien 2-Hydroxy-Östrogene. Durch die Zugabe der Hydrolyselösung und der Natronlauge zur Neutralisation wird die Extraktion erschwert, da sich Äther- und Wasserphase nach dem Mischen nur durch Zentrifugieren trennen lassen.
Außerdem ergibt sich bei diesem Verfahren mit 75,1 ± 1,4 % eine geringere Wiederfindung. Mit 7,0 ± 1,3 pg pro Ansatz sind auch die Leerwerte wesentlich höher, als bei der Bestimmung der freien 2-Hydroxy-Östrogene.
Entsprechend den angegebenen Leerwerten, Wiederfindungen und der eingesetzten Serummengen errechnet sich für die Bestimmung der freien 2-Hydroxy-Östrogene mit 11 pg/ml eine wesentlich niedrigere Grenze der Nachweisbarkeit, als für die Bestimmung der freien und konjugierten 2-Hydroxy-Östrogene mit 128 pg/ml.
Ein deutlicher Hinweis auf die hohe Spezifität der Methode ergab sich aus der vergleichenden Bestimmung eines Schwangerenserums mit und ohne Reinigungsschritt mittels Säulenchromatographie. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, unterscheiden sich die gefundenen Werte nur geringfügig.
Richtigkeit und Präzision erwiesen sich als nahezu identisch für beide Verfahren. Sie entsprechen den allgemeinen Anforderungen, die an einen Radioimmunoassay gestellt werden.
Durch tägliche Bestimmung eines Kontrollserums wurde die zeitliche Konstanz der Ergebnisse nachgewiesen.
Eine wichtige Voraussetzung für die angegebenen niedrigen Variationskoeffizienten der Reproduzierbarkeit war vermutlich die möglichst exakte und von Tag zu Tag dem gleichen Zeitplan folgende Durchführung der Versuche. So wurde z. B. genau darauf geachtet, die Inkubationszeiten für alle Proben immer

gleich lang zu halten. Trotzdem geriet im Zeitraum, in dem die Bestimmungen durchgeführt wurden, die Methode zweimal für die Dauer einiger Versuchstage ohne ersichtlichen Grund außer Kontrolle. Diese Versuchstage sind in Abb. 3 nicht erfaßt.
Ein Vergleich der Ergebnisse für die Bestimmung der freien 2-Hydroxy-Östrogene dieser Arbeit mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen findet sich in Tabelle 4.
Die ermittelten Konzentrationen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen stimmen gut mit den Werten von Ball et al. (5) überein. Im Serum von Frauen in der Postmenopause fanden sich wesentlich niedrigere Werte als im Serum von Männern und Frauen in der geschlechtsreifen Phase.
Yoshizawa und Fishman (53) bestimmten nahezu 10fach höhere Werte für das dritte Trimester der Schwangerschaft und auch höhere Werte für den Zyklus der Frau.
Im Gegensatz dazu fanden Kono et al. (37) mit einer Methode, die eine zusätzliche Reinigung des Serumextraktes mittels Säulenchromatographie einschließt, Werte, die lediglich in der Schwangerschaft über der Nachweisbarkeitsgrenze der Methode von 15 pg/ml liegen.
Die Werte stehen in Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit, da eine Reinigung des Ätherextraktes über Säulenchromatographie in unserem Fall keinen wesentlichen Einfluß auf das Ergebnis hatte.
Bemerkenswerte Ergebnisse lieferte der direkte Vergleich der Konzentrationen freier 2-Hydroxy-Östrogene im Serum von Müttern unter der Geburt mit den zugehörigen Nabelschnurseren. Im Serum der Nabelschnur fanden sich signifikant ($p < 0{,}001$) höhere Werte als im Serum der Mutter.

Ball et al. (5) wiesen bisher als einzige auf erste Ergebnisse für die Bestimmung von konjugierten 2-Hydroxy-Östrogenen hin. Sie erhielten Werte, die um einen Faktor 10 - 20 höher lagen als ihre Bestimmung der freien 2-Hydroxy-Östrogene.
Dies trifft auch für unsere Ergebnisse zu. Im Serum von geschlechtsreifen Frauen in der Follikel- und Lutealphase, sowie bei Frauen in der Postmenopause und bei Männern fanden sich Werte, die um einen Faktor 10 - 15 höher lagen als die Bestimmungen der freien 2-Hydroxy-Östrogene. Wiederum waren die Werte für die Postmenopause signifikant niedriger als die Ergebnisse des weiblichen Zyklus oder Männerserums.

Wie man aus Abbildung 4 ersehen kann, unterscheiden sich im Verlauf der Schwangerschaft die Serumkonzentrationen von freien und gesamten 2-Hydroxy-Östrogenen nahezu konstant um den Faktor 20.

Tabelle 4 Serumkonzentrationen freier 2-Hydroxy-Östrogene

Autor	Gruppe	Bereich (pg/ml) od. MW ± s	n
Yoshizawa and Fishman (53)	Männer	28 - 39	6
	Postmenopause	24 - 72	8
	Zyklus	108 - 295	6
	Schwangerschaft (3. Trimester)	1200 - 3600	3
Ball et al. (5)	Männer	40 - 65	9
	Postmenopause	40 - 70	4
	Follikelphase	50 - 70	3
	Periovulation	65 - 95	3
	Schwangerschaft	105 - 220	24
diese Arbeit	Männer	29 ± 5	11
	Postmenopause	13 ± 3	10
	Follikelphase	32 ± 8	25
	Lutealphase	53 ± 13	24
	14. - 16. SSW	68 ± 11	14
	23. - 25. SSW	127 ± 19	14
	38. - 40. SSW	240 ± 23	26
Kono et al. (37)	Männer	< 15	8
	Zyklus	< 15	13
	Schwangerschaft		
	1. Trimester	20 ± 8	7
	2. Trimester	58 ± 13	3
	3. Trimester	177 ± 66	12

6. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe eines Radioimmunoassays wurden freie und freie + konjugierte 2-Hydroxy-Östrogene bei gesunden Männern und Frauen bestimmt. Zur Bestimmung der freien 2-Hydroxy-Östrogene wurden die Serumproben direkt, zur Bestimmung der freien + konjugierten 2-Hydroxy-Östrogene nach Säurehydrolyse mit Diäthyläther extrahiert.
Auf eine chromatographische Reinigung der Serumextrakte wurde auf Grund einer vergleichenden Bestimmung eines Schwangerenserums mit und ohne Reinigung durch Säulenchromatographie, bei der praktisch gleiche Werte gefunden wurden, verzichtet.
Die Reagenzien-Leerwerte lagen bei 2,8 ± 0,5 pg pro Ansatz (freie 2-Hydroxy-Östrogene) bzw. 7,0 ± 1,3 pg pro Ansatz (freie + konjugierte 2-Hydroxy-Östrogene). Richtigkeit und Präzision entsprechen den allgemeinen Anforderungen für einen Radioimmunoassay.

Die Bestimmung von 2-Hydroxy-Östrogenen im menschlichen Serum unter verschiedenen physiologischen Bedingungen erbrachte folgende Ergebnisse:

	freie 2-Hydroxy-Östrogene pg/ml	freie + konj. 2-OH-Östrogene pg/ml	n
Männer	29 ± 5	453 ± 67	11
Postmenopause	13 ± 3	211 ± 45	10
Follikelphase	32 ± 8	429 ± 47	25
Lutealphase	53 ± 13	519 ± 49	24
14. - 16. SSW	68 ± 11	2107 ± 253	14
23. - 25. SSW	127 ± 19	2911 ± 350	14
38. - 40. SSW	240 ± 23	4318 ± 538	24

Zusätzlich wurden die 2-Hydroxy-Östrogene im Serum sowohl von Müttern unmittelbar nach der Geburt, wie auch der Neugeborenen vergleichend bestimmt. Dabei ergaben sich für freie 2-Hydroxy-Östrogene im Nabelschnurserum (603 $\pm$ 38 pg/ml, n = 24) signifikant höhere Werte als für die Mutter am Termin (235 $\pm$ 22 pg/ml, n = 24).
Für die konjugierten 2-Hydroxy-Östrogene konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Mutter am Termin: 3150 $\pm$ 215 pg/ml, n = 24; Nabelschnurserum: 3298 $\pm$ 295 pg/ml, n = 24).

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abraham, G. E. and Grover, P. K.
In 'Principles of competitive protein binding assay' (Odell, W. D. and Daughaday, W. H., eds.), Lipincott, Philadelphia, 140 - 157, (1971)

2. Adlercreutz, H. and Luukkainen, T.
Identification and determination of estrogens in various biological materials in pregnancy.
Annals of Clinical Research 2, 365 - 380, (1970)

3. Allen, R. and Redshaw, M. R.
The use of homologous and heterologous ^{125}J-radioligands in the radioimmunoassay of progesterone.
Steroids 32, 467 - 486, (1978)

4. Ball, P. and Knuppen, R.
Catecholestrogens
Acta Endocrinologica Vol. 93, Suppl. 232, (1980)

5. Ball, P., Emons, G., Haupt, O., Hoppen, H. O. and Knuppen, R.
Radioimmunoassay of 2-hydroxyestrone.
Steroids 31, 249 - 257, (1978)

6. Ball, P., Farthmann, E. and Knuppen, R.
Comparative studies on the metabolism of estradiol-17ß and 2-hydroxyestradiol-17ß in man in vitro and in vivo.
J. Steroid Biochem. 7, 139 - 143, (1976)

7. Ball, P., Gelbke, H. P., Haupt, O. and Knuppen, R.
Metabolism of 17a-ethynyl-(4-^{14}C) estradiol and

($4-^{14}C$) mestranol in rat liver slices and interaction between 17a-ethynyl-2-hydroxyestradiol and adrenalin.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1567 - 1575, (1973)

8. Ball, P., Knuppen, R., Haupt, M. and Breuer, H.
Interactions between estrogens and catecholamines. III. Studies on the methylation of catecholestrogens, catecholamines and other catechols by the catechol-O-methyltransferase of the human liver.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 34, 736 - 746, (1972)

9. Ball, P. and Knuppen, R.
Formation of 2- and 4-hydroxyestrogens by brain, pituitary and liver of the human fetus.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47, 732, (1978)

10. Berg, D. und Kuss, E.
Synthesis of an immunogen with catecholestrogen as immunodeterminant groups and its characterization by the induced antibodies.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1683 - 1684, (1979)

11. Berg, D., Huber, W. und Kuss, E.
Synthesis of ^{125}Jodine labelled indicator haptens for radioimmunological determination of catecholestrogens.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1685 - 1687, (1979)

12. Breuer, H. und Knuppen, R.
Biogenese von 2-Methoxyoestradiol-(17ß) in der menschlichen Leber.

Naturwissenschaften 47, 280 - 281, (1960)

13. Breuer, H., Knuppen, R. and Haupt, O.
Effect of 2-substituted estrogens on the enzymatic methylation of catecholamines in human liver.
Biochem. J. 118, 9P, (1970)

14. Breuer, H. and Köster, G.
Interaction between estrogens and neurotransmitters at the hypophysial-hypothalamic level.
J. Steroid Biochem. 5, 961, (1974)

15. Breuer, H., Lubrich, W. und Knuppen, R.
Wirkung von phenolischen Steroiden auf die Methylierung von Brenzkatechinaminen.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 3, (1968)

16. Cantrall, E. W., Bernstein, S. and Cekleniak, W.
Hypercholesterolemia treatment
Chem. Abs. 62, 1522c, (1965)

17. Chesley, L. C., Talledo, E., Bohler, C. S. and Zuspan, F. P.
Vascular reactivity to angiotensin II and norepinephrine in pregnant and nonpregnant women.
Am. J. Obstet. Gynecol. 91, 837 - 842, (1965)

18. Eckert, H. G.
Die Technik des Radioimmunoassays
Angewandte Chemie 17, 565 - 574, (1976)

19. Erlanger, B. F., Borek, F., Beiser, S. M. and Liebermann, S.
Steroid-Protein Conjugates
II. Preparation and characterization of conjugates

of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone and estrone.
J. Biolog. Chem. 234, 1090 - 1094, (1959)

20. Fishman, J.
Catechol estrogen formation by the rat hypethalamus. In Abstract book 'The Endocrine Society, 55th Annual Meeting' Conrad Hilton, Chicago, USA, p. A 68, (1973)

21. Fishman, J.
The catechol estrogens
Neuroendocrinology 22, 363 - 374, (1976)

22. Fishman, J., Boyar, R. M. and Hellman, L.
Influence of body weight on estradiol metabolism in young women.
Clin. Endocrin. Metabol. 41, 989, (1975)

23. Fishman, J. and Dixon, D.
2-Hydroxylation of estradiol by human placental microsomes.
Biochemistry 6, 1683 - 1687, (1967)

24. Fishman, J., Hellman, L., Zumoff, B. and Gallagher, T. F.
Influence of thyroid hormone on estrogen metabolism in man.
J. Clin. Endocrinol. Metabol. 22, 389, (1962)

25. Fishman, J. and Norton, B.
Brain catechol estrogens - Formation and possible function.
In 'Advances in Biosciences 15, Schering Workshop in Central Actions of Estrogenic Hormones'

(G. Raspé, ed.) Pergamon Press, Oxford 123 - 131, (1975)

26. Fishman, J. and Norton, B.
Catechol estrogen formation in the central nervous system of the rat.
Endocrinology 96, 1054 - 1059, (1975)

27. Foreman, M. M. and Porter, J. C.
Direct inhibitory effect of catechol estrogens upon rat hypothalamic and striatal tyrosine hydroxylase activity. In Abstract book 'The Endocrine Society 61st Annual Meeting' Anaheim, California, USA, p. 124, (1979)

28. Gelbke, H. P., Ball, P. and Knuppen, R.
In Advances in Steroid Biochemistry and Pharmacology (Briggs, M. M. and Christie, G. A., eds.) Academic Press, New York, 81 - 154, (1977)

29. Gelbke, H. P. und Knuppen, R.
The excretion of five different 2-hydroxyestrogen monomethyl ethers in human pregnancy urine.
J. Steroid Biochem. 7, 457 - 463, (1976)

30. Gordon, S., Cantrall, E. W., Cekleniak, W. P., Albers, H. J., Maurer, S., Stolar, S. M. and Bernstein, S.
Steroid and lipid metabolism. The hypocholesteremic effect of estrogen metabolites.
Steroids 4, 267 - 271, (1964)

31. Gugler, R., Knuppen, R. and Breuer, H.
Reinigung und Charakterisierung einer S-Adenosyl-Methionin: Catechol-O-Methyltransferase der

menschlichen Plazenta.
Biochem. Biophys. Acta 220, 10 - 21, (1970)

32. Gethmann, U. and Knuppen, R.
Effect of 2-hydroxyestrone on lutropin (LH) and follitropin (FSH) secretion in the ovarectomized primed rat.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1011, (1976)

33. Hellman, L., Zumoff, B., Fishman, J. and Gallagher, T. F.
Estradiol metabolism in total extrahepatic biliary obstruction.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 30, 161 - 165, (1970)

34. King, R. J. B.
Östriol metabolism by rat- and rabbit-liver slices. Isolation of 2-methoxyöstriol and 2-hydroxyöstriol.
Biochem. J. 79, 355 - 361, (1961)

35. King, R. J. B.
Metabolism of oestriol in vitro. Cofactor requirements for the formation of 2-hydroxyoestriol and 2-methoxyoestriol.
Biochem. J. 79, 361 - 369, (1961)

36. Knuppen, R., Lubrich, W., Haupt, O., Ammerlahn, U. und Breuer, H.
Beeinflussung der enzymatischen Methylierung von Catecholaminen durch Östrogene und vice versa.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1209, (1972)

37. Kono, S., Brandon, D., Merriam, G. R., Loriaux, D. L. and Lipsett, M. B.
Low plasma levels of 2-hydroxyestrone are consistent

with its rapid metabolic clearance.
Steroids 36, 463 - 471, (1980)

38. Lloyd, T. and Weisz, I.
Direct inhibition of tyrosine hydroxylase activity by catechol estrogens.
J. Biol. Chem. 253, 4841 - 4843, (1978)

39. Marks, F. und Hecker, E.
Beziehungen zwischen Östrogenstoffwechsel und Lipidperoxidation in Rattenlebermikrosomen.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 523, (1968)

40. Martucci, Ch. and Fishman, J.
Uterin estrogen receptor binding of catecholestrogens and of estetrol.
Steroids 27, 325, (1976)

41. Martucci, Ch. and Fishman, J.
Direction of estradiol metabolism as a control of its hormonal action. Uterotrophic activity of estradiol metabolites.
Endocrinology 101, 1709, (1977)

42. Martucci, Ch. and Fishman, J.
Impact of continuously adminstered catechol estrogens on uterine growth and LH secretion.
Endocrinology 105, 1288, (1979)

43. Merriam, G. R., Brandon, D., Kono, S., Davis, S. E., Loriaux, D. L. and Lipsett, M. B.
Metabolic clearance of the catechol estrogen 2-hydroxyestrone.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 51, 1211 - 1213, (1980)

44. Naftolin, F., Morishita, H., Davies, I. J., Todd, R., Ryan, K. J. and Fishman, J.
2-hydroxyestrone induced rise in serum LH in the immature male rat.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 905, (1975)

45. Raith, L.
Introduction to radioimmunoassay methods.
Byk-Makinckrodt Radiopharmazeutika-Diagnostika (1975)

46. Richterich, R.
Zuverlässigkeit von Labormethoden und Qualitätskontrolle.
In Klin. Chemie 3. Auflage, Basel, (1971)

47. Sachs, L.
Statistische Methoden
4. Auflage, Berlin, (1979)

48. Scatchard, G.
The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann. N. Y., Acad. Sci. 51, 660 - 672, (1949)

49. Weir, R. I., Tree, M. and Frazer, R.
Effect of oral contraceptives on blood pressure and on plasma renin, renin substrate and corticosteroids.
J. Clin. Pathol. (Lond.) 23, Suppl. 3, 49 - 54 (1970)

50. Westerfeld, W. W.
The inactivation of oestrone
Biochem. J. 34, 51 - 58, (1940)

51. Yalow, R. S. and Berson, S. A.
Quantitative Aspects of the reaction between Insulin and Insulin-Binding Antibody.
J. Clin. Invest. 38, 1996 - 2016, (1959)

52. Yalow, R. S. and Berson, S. A.
Immunoassay of endogenous Plasma Insulin in Man.
J. Clin. Invest. 39, 1157 - 1175, (1960)

53. Yoshizawa, I. and Fishman, J.
Radioimmunoassay of 2-hydroxyestrone in human plasma.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 32, 3 - 6, (1971)

54. Zumoff, B., Fishman, J., Gallagher, T. F. and Hellman, L.
Estradiol metabolism in cirrhosis.
J. Clin. Invest. 47, 20 - 25, (1968)

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Erich Kuss, möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und Unterstützung bei der Durchführung und Ausarbeitung meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Josef Zander danke ich für die guten Arbeitsmöglichkeiten in seinem Forschungslabor und für die Übernahme des Coreferates.

Herrn Dr. Dieter Berg danke ich für viele Diskussionen und Hinweise, sowohl im experimentellen Abschnitt, als auch in der Ausarbeitung des Themas.

Lebenslauf

15. Jan. 1956	geboren in Titlmoos (Lkr. Rosenheim) als Sohn der Eheleute Sebastian Thaler und Maria Thaler, geb. Wolfswinkler
1962 - 1966	Besuch der Volksschule Waldhausen
1966 - 1969	Gymnasium Pfarrkirchen
1969 - 1975	Luitpold-Gymnasium Wasserburg a. Inn
20. Juni 1975	Abitur
WS 1975/76 - SS 1978	Physik/Diplom - Studium an der LMU München
25. Juni 1977	Heirat mit Hannelore Thaler, geb. Peters
22. März 1978	Vordiplom in Physik
SS 1977 - WS 1978/79	Vorklinisches Studium der Medizin an der LMU München
20. März 1979	Ärztliche Vorprüfung
SS 1979 - SS 1983	Klinisches Studium der Medizin an der LMU München
20. März 1980	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
19. März 1982	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
07. April 1983	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung schriftlicher Teil
18. April 1983	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mündlicher Teil